

マウス IgG₁ 抗体産生細胞と IgG₁ 産生形質細胞腫に 共通する特異抗原に関する研究

金沢大学癌研究所分子免疫部（主任：右田俊介教授）

大 圓 修 身

（昭和54年7月10日受付）

本論文の要旨は第7回日本免疫学会において発表した。

免疫担当細胞の分化と機能の相互関係を検討する上で、ある特定の機能をもつ細胞集団に特有の膜抗原が存在すれば、細胞集団を同定する上で、それは、一つの有力な手段となりうる。

免疫担当細胞のうち、T細胞には、種々の機能をもつ亜集団が存在する。これら亜集団は、それぞれが有する特異膜抗原-Ly抗原¹⁾、Ia抗原²⁾³⁾によって血清学的に分類されている。T細胞は、細胞集団の特定の機能が特定の膜抗原によって分類された典型的な例である。

一方、B細胞にも、以下のように明らかな機能分化が知られている。つまり、1) B細胞によって産生される免疫グロブリンは、いくつかのクラス、サブクラスに分けられる。2) 免疫グロブリンのクラス、サブクラス産生には、各々の産生細胞毎に、T細胞依存性に相違がみられ、とくにIgG₁、IgG_{2b}、IgG_{2a}、IgAは、その依存性が高い。一方、IgMには、T細胞依存性は少ない。3) 同一ハプテン(trinitro phenyl 基 TNP)にキャリアーとしてT細胞依存性抗原あるいは非依存性抗原を結合させた抗原を準備し、両抗原を等量混合して免疫した場合には、脾細胞中にみられる抗ハプテン抗体産生細胞数は、どちらか一方の抗原のみで免疫した場合の和に等しいと報告されている⁴⁾。従って、T細胞依存性抗原と非依存性抗原に反応するB細胞は明らかに異なる亜集団と考えられている。4) 抗体産生におけるT細胞の機能には、免疫グロブリンのサブクラス別特異性⁵⁾が知られており、そのT細胞の調節は、B細胞が抗原で刺激された後に出現する受容体を通して

行なわれている。

以上のように、B細胞にもT細胞と同様、いくつかの機能分化が明確になっているが、T細胞に認められるような機能分化と膜抗原の関係については明らかでない。

そこで、B細胞の単一クローンであるマウス形質細胞腫を材料に、ウサギ抗MOPC31C(IgG₁産生株)血清を作製し、IgG₁抗体産細胞に特有な膜抗原が存在するのかを明確にする事を目的とした。

結果は、(1)抗血清はIgG₁抗体産細胞に特異的に反応した。(2)抗血清はマウス免疫グロブリンIgG₁とは反応しないし、(3)IgG₁抗体産細胞との反応は、マウス主要組織適合抗原H-2、免疫グロブリンのアロタイプと無関係であった。

したがって、IgG₁産生形質細胞腫には、正常IgG₁抗体産細胞と共通する特異抗原が存在すると推定された。

実験材料および実験方法

I. 動物

生後2-3ヵ月令のBALB/c、C3H/He、SJL/J、(BALB/c × C3H/He)一代雑種(以下F₁)を使用した。BALB/c、C3H/Heマウスは静岡実験動物協会より購入し、(BALB/c × C3H/He)F₁は、当教室にて繁殖、飼育した。SJL/Jマウスは、愛知ガンセンターより寄与をうけた。

II. 形質細胞腫

使用した形質細胞腫は、BALB/c由来のMOPC31C

Specific antigen shared with plasmacytoma cell and B lymphocytes, producing IgG₁ immunoglobulin. Osami Daimaru, Department of Molecular Immunology (Director Research of Institute, Kanazawa university).

(IgG₁ k 型), MOPC11(IgG_{2b} k 型), MOPC104E(IgM λ 型), および C3H/He 由来 X 5563(IgG_{2a} k 型) である。腫瘍はいづれも腹水型で継代移植した。

Ⅲ. 抗原および投与スケジュール

ヒツジ赤血球 (Sheep red blood cell : SRBC) (日本生物材料センター東京) 10^9 個をマウス腹腔に注射した。1 次免疫反応の測定は、注射 4 日後に、2 次免疫反応の測定には、1 回注射後 1 週目に再び 10^9 個 SRBC を腹腔に注射し、2 回注射より 1 週後に、脾細胞中の抗体産生細胞数で検討した。

Ⅳ. 培養液および細胞浮遊液

使用した培養液は、RPMI - 1640 培地 (日水製薬社製 東京) で、これに、5% 非動化仔牛血清 (Microbiological Associate, U.S.A.) を加え、さらにペニシリン (明治製菓 東京) を 100 単位 / ml, 硫酸ストレプトマイシン (科研, 東京) を 100 μg / ml を加え、加圧滅菌して使用した。

細胞浮遊液: マウス脾臓を氷冷した培養液中に取り出し、2 枚のスライドガラスで脾臓をつぶし、細胞浮遊液とした。これをステンレススチールのメッシュに通し、800 回転 10 分遠心し、上清を捨てた後、培養液で懸濁した。

Ⅴ. 溶血斑形成細胞法 (plaque forming cell PFC)

カンニンガム変法⁶⁾によって行なった。免疫脾細胞浮遊液 0.5 ml に、50% SRBC 0.05 ml およびモルモット補体 0.05 ml を加え、氷浴中で混和した。この混合液をカンニンガムチャンバー (高橋技研製) に注入し、パラフィンで封入後、37°C 60 分反応させ、溶血斑 (plaque) を顕微鏡下で数えた。なお、使用したモルモット補体は、モルモット凍結乾燥補体 (極東社, 東京) を、あらかじめマウス脾細胞、胸腺細胞、SRBC で吸収した。

また、間接 PFC 法に使用したマウスの各クラス、サブクラスに対するウサギ抗マウス血清の希釈は、抗 IgG₁ 血清 500 倍、抗 IgG_{2a} 血清 130 倍、抗 IgG_{2b} 血清 500 倍、抗 IgA 血清 300 倍で使用した。PFC に使用したマウス各クラス、サブクラス免疫グロブリンに対するウサギ抗血清は、金沢大、がん研、免疫生物部、坂井俊之助博士より分与された。

Ⅵ. ウサギ抗 MOPC31C 血清の作製

1×10^8 個生細胞 MOPC31C をウサギ耳静脈および頸部皮下に 1 週間隔で交互に、計 8 回注射した。最終注射後 10 日目に採血し、抗血清を得た。抗血清は 56°C 30 分で非動化した後、50% 飽和硫酸で塩析し、粗 IgG 分画をえた。これを 0.15M NaCl を含む 0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (以下 PBS) で一昼夜透析した。透析後、マウス赤血球、肝臓、腎臓で吸収した。

Ⅶ. 細胞傷害試験

(1) トリパンブルー染色法

Boyse の方法を用いた⁷⁾。 1×10^7 / ml の細胞浮遊液 50 μl に、希釈抗血清 50 μl を加え、37°C で 15 分間反応後、補体 50 μl を加え 37°C で 45 分間反応させた。次いで 0.5% トリパンブルー液で死細胞を染色した。細胞傷害率 (%) は次の式よりもとめた。

細胞傷害率 (%) =

$$\frac{\text{死細胞率(抗血清)} - \text{死細胞率(正常血清)}}{\text{生細胞率(正常血清)} - \text{生細胞率(抗血清)}} \times 100$$

使用した補体による細胞傷害は 10% 以下であった。

(2) ⁵¹Cr 標識法

Wigzell の方法⁸⁾にしたがい、⁵¹Cr で標的細胞を標識して用いる細胞傷害試験を行なった。 1×10^7 個 / ml の細胞に 100 μCi Na₂ ⁵¹CrO₄ (10.5 mCi/ml) を加え、37°C で 45 分反応させた。反応後 PBS を加え、800 回転 10 分遠心し、上清を捨て、 1×10^7 / ml に培養液で懸濁し、その 50 μl を標的細胞とした。抗血清と補体による標的細胞破壊にもとづく ⁵¹Cr の放出を試験群とし、正常ウサギ血清と補体による ⁵¹Cr の放出を自然放出とした。また、⁵¹Cr 標識細胞を 0.5% NP-40 (Shell U.S.A.) で可溶化した ⁵¹Cr の放出を最大放出とし、次の式より細胞傷害率 (%) をもとめた。

細胞傷害率 (%) =

$$\frac{\text{試験群 cpm} - \text{自然放出 cpm}}{\text{最大放出 cpm} - \text{自然放出 cpm}} \times 100$$

Ⅷ. 間接膜蛍光法

ウサギ抗 MOPC31C 血清を、細胞浮遊液とともに、室温で 20 分反応させ、氷冷 PBS を加え、800 回転 10 分間遠心し上清を除いた。この細胞洗滌操作を 2 回くり返した後、細胞沈渣に FITC 結合ヒツジ抗ウサギ IgG 血清 (40 倍希釈) を 50 μl 加え、氷浴中で 20 分反応させた。その後、氷冷 PBS を加え、800 回転 10 分遠心し上清を除いた。この細胞洗滌操作を 2 回くり返した後、沈渣の細胞を蛍光顕微鏡 (千代田製) のもとで観察し、細胞数 200 個あたりの陽性細胞数をもとめた。

なお、FITC 結合ヒツジ抗ウサギ IgG 血清は、川村⁹⁾らの方法にしたがい作製し、色素対蛋白結合比が 1 ~ 2 のものを使用した。

Ⅸ. 沈降反応

正常マウス IgG 分画および MOPC 31C M 成分に Na¹³¹I を、クロラミン法¹⁰⁾で標識した。¹³¹I 標識材料 0.1 ml (0.65 μg) にウサギ抗 MOPC 31C 血清、または、ウサギ抗マウス IgG₁ 血清を 0.1 ml 加え、37°C、60 分反応後、ヒツジ抗ウサギ IgG 血清を 0.1 ml 加え、再び

37°C, 60分間反応させ, 4°C で一昼夜反応させた。抗体活性は, 次の式よりもとめた。

$$\text{抗IgG}_1 \text{ 活性}(\%) = \frac{\text{沈澱 cpm}}{\text{上清 cpm} + \text{沈澱 cpm}} \times 100$$

なお, ^{131}I 標識材料中の ^{131}I 結合総蛋白のアイソトープ量は, 20%トリクロール酢酸(TCA)で沈澱した ^{131}I cpm 量でもとめた。

X. ウサギ抗 MOPC 31C 血清の PFC への効果

10^7 個免疫脾細胞を, 希釈した抗血清または非働化正常ウサギ血清とともに, 37°C, 45分間反応させた後, PBS を加え, 800回転10分遠心後, 細胞沈澱について PFC をみた。抗血清による PFC への効果は, 次の式よりもとめた。

$$\text{抑制率}(\%) = 100 - \frac{\text{抗血清処理 PFC 数}}{\text{正常血清処理 PFC 数}} \times 100$$

XI ウサギ抗 MOPC 31C 血清の分泌への効果

腹水型形質細胞腫は, 担癌マウスより, ヘパリンを加えた滅菌培養液に無菌的に取り出した。800 回転 10 分遠心後, 混在する赤血球を溶血させるため Tris - 塩化アンモニウム液を加え, 氷浴中で 5 分間反応させた。再び培養液を加え, 500 回転 10 分間遠心し, 形質細胞腫細胞を $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した後, この細胞浮遊液に $10\mu\text{Ci } ^3\text{H-L-leucine}$ (120 Ci/mmol, Radiochemical Center) を加え 37°C, 5% CO_2 のもとで 2 時間反応させた。再び培養液を加え, 800 回転 10 分間遠心し, 上清を除き, $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。この細胞浮遊液に, ろ過滅菌した抗 MOPC 31C 血清, または, 正常ウサギ血清を $100\mu\text{l}$ 加えて 37°C, 5% CO_2 のもとで反応させ, 細胞内 ^3H 標識蛋白と細胞外へ分泌された ^3H 標識蛋白を 10% TCA 沈澱の ^3H を測定して求めた。

ヘパリンは培養液に 10 単位/ml 加えて使用した。また抗血清のろ過滅菌にはミリポアフィルター (0.45 μm) を使用した。

成 績

I. 抗血清の吸収と細胞傷害性

1). 未吸収ウサギ抗 MOPC 31C 血清は, 図 1 にみられるように, MOPC 31C に 150 倍希釈まで, 100% の傷害性を示した。また, 抗血清は, BALB/c 由来形質細胞腫 MOPC11, MOPC104E や, C3H/He 由来形質細胞腫 X 5563 に対しても, MOPC 31C 同様高い傷害性を示した。さらに, BALB/c 脾細胞, 胸腺細胞にも高い傷害性がみられた。

2). 次に抗血清を BALB/c 胸腺細胞で吸収した。

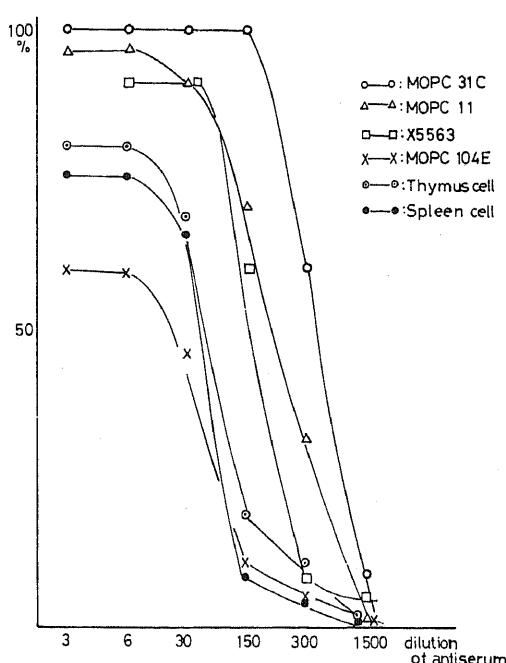


Fig. 1 Cytotoxic activity of unabsorbed Rabbit anti-MOPC 31C

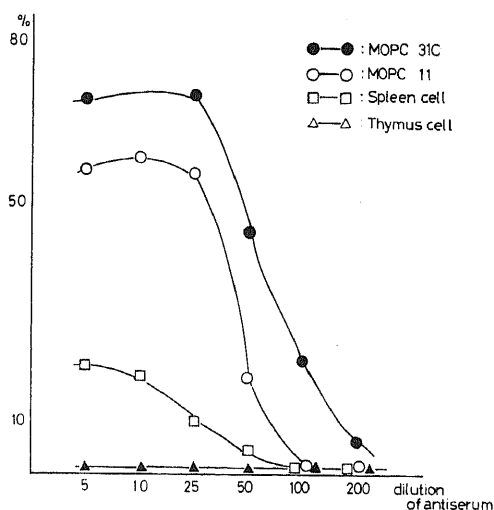


Fig. 2 Cytotoxic activity of Rabbit anti MOPC 31C serum after the absorption with Thymus cells

抗血清に BALB/c 胸腺細胞を加え, 37°C で 60 分間反応後, 800 回転 10 分遠心し, 上清を吸収抗血清 (Rabbit anti-mouse B cell serum RAMB) とした。RAMB の細胞傷害性は, 図 2 に示すように, MOPC

31C および MOPC11 に高値を示した。また、脾細胞にも約 20 % の傷害性がみられた。一方、胸腺細胞に対しては傷害性がみられなかった。

このことより、RAMB は、B 細胞¹¹¹¹²¹または、形質細胞腫に共通した抗原¹³¹¹⁴¹¹⁵¹に活性をもっと考えられた。

3). RAMB は MOPC11 (IgG_{2b} 産生株)にも傷害性を有したので、MOPC11 で吸収し、抗 B 細胞活性¹¹¹¹²¹、形質細胞腫共通抗原¹³¹¹⁴¹¹⁵¹に対する活性を除去した。図 3A にみられるように、吸収に用いる MOPC11 の細胞数を増加させると、MOPC11 に対する細胞傷害性は急速に低下し、 10^7 個の MOPC11 で吸収すると、MOPC11 および脾細胞に対する傷害性は消失した。一方 MOPC 31C には、なお、傷害性が認められた。しかし、 5×10^7 個以上で、RAMB を吸収すると、もはや、MOPC 31C にも傷害性はみられなくなった。

そこで、抗体価を鋭敏に測定できる蛍光抗体法と、標的細胞に⁵¹Cr を標識した細胞傷害法で、RAMB の特異性をしらべた。

図 3A にみられるように、細胞傷害法でみられた抗体活性 (Δ - Δ) は、MOPC 31C に対して 60 % であったのに比べ、間接蛍光法 (\circ - \circ) では、75 % と高値を示した。RAMB を MOPC11 5×10^7 個以上で吸収すると、MOPC11 (\bullet - \bullet) に対する活性は全く消失した。一方、MOPC 31C (\circ - \circ) へは、RAMB を 5×10^7 個 MOPC11 で吸収しても、なお、10 % の陽性細胞がみ

られた。

⁵¹Cr 標識標的細胞を用いた細胞傷害試験を行なった。結果は、図 3B に示すように、MOPC11 5×10^7 個で吸収した抗血清は、MOPC11 には何ら傷害性を示めさないが、MOPC 31C に対しては 15 % の傷害性を示した。この抗血清を、Rabbit anti MOPC 31C monospecific serum (RAM 31C) とした。

II. 抗血清の抗体産生細胞への効果

従来から、異種で作製した抗血清-ウサギ抗マウス B 細胞血清¹¹¹¹²¹、または、ウサギ抗形質細胞腺血清¹³¹¹⁴¹¹⁵¹と補体でマウス正常脾細胞を処理して、in vivo へ養子移入を行ない抗原で免疫脾細胞を抗血清と補体で処理した後は、PFC 法で抗体産生細胞が全く消失するなどの報告がなされている。

そこで、免疫脾細胞を RAMB または、RAM 31C で処理した後の直接 PFC および間接 PFC に対する効果を検討した。とくに、MOPC 31C は、IgG₁ 産生細胞などで、各 IgG サブクラス毎の PFC 数への効果をみた。

1). 直接 PFC への効果

4 日前に 10^9 個 SRBC で免疫した BALB/c 脾細胞を RAMB で処理し、PFC をみた。対照には正常ウサギ血清 (Normal Rabbit serum NRS) を用いた。結果は、図 4 にみられるように、RAMB 5 倍希釈まで、100 % の抑制がみられた。RAMB を MOPC11 で定量吸収した後、同様にして PFC への抑制効果をみると、MOPC11 の細胞数を増加させるにともない、PFC の抑

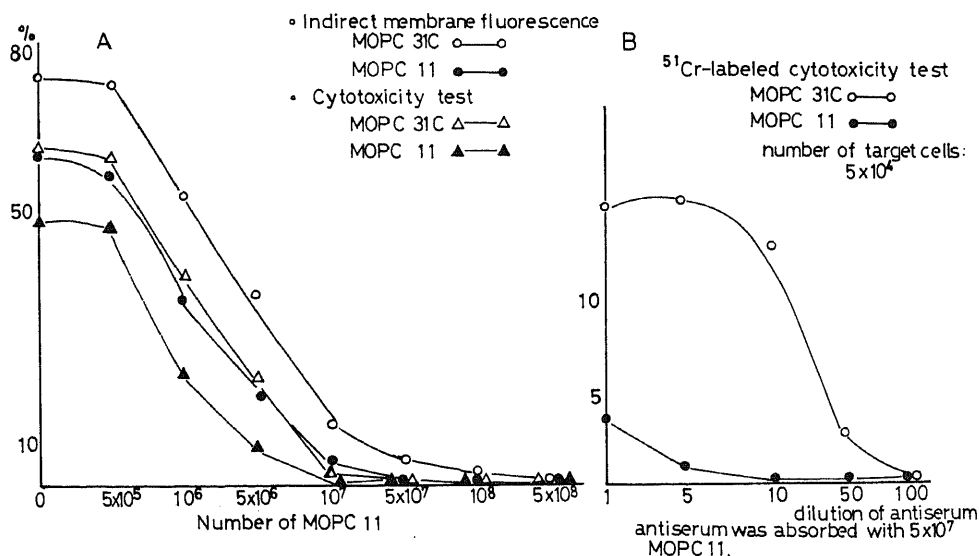


Fig. 3 Absorption of Rabbit anti MOPC 31C

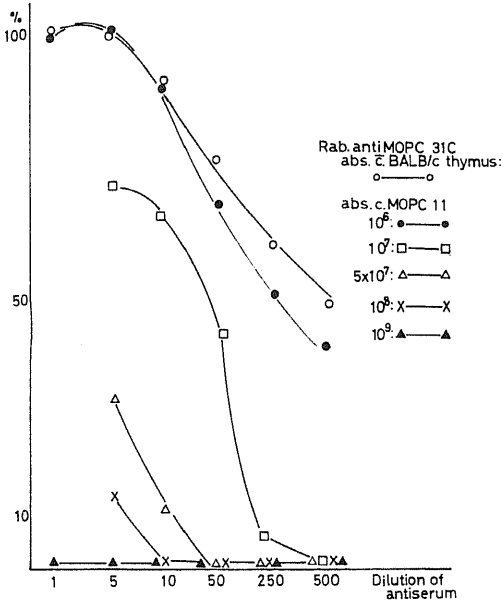


Fig. 4 Suppression of Direct PFC after the absorption with MOPC 11

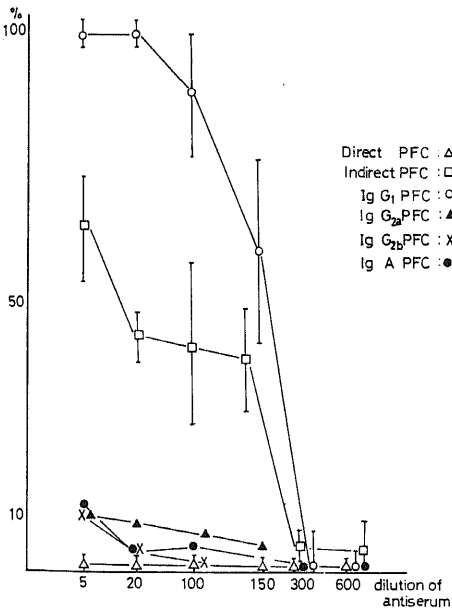


Fig. 5 Suppression of Indirect PFC in SRBC immunized BLB/C mice

制率は低下した。RAMBをMOPC11 (5×10^7 個)で吸収しMOPC 31Cへ特異的となった抗血清(RAMBIC)でも、なお、5倍希釈で30%のPFC抑制がみられた。しかし、 10^8 個で吸収すると直接PFCの抑制は、ほとんどみられなくなった。

以上の結果、抗MOPC 31C血清は、MOPC 31Cに特異的となるにつれ、直接PFCを抑制しなくなるといえる。

2). 間接PFCへの効果

SRBCで2次免疫したBALB/C脾細胞をRAM 31Cで処理し、クラス、サブクラス毎の間接PFC数をみた。結果は図5にみられるように、IgG₁PFCのみ96.4 \pm 4.3%抑制され、この抑制は、RAM 31Cの20倍希釈まで同程度みられた。一方、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgA PFCには何ら抑制効果はみられなかった。

次に、この抑制機序について検討した。

Ⅲ. 抑制効果の機序

RAM 31Cが、IgG₁抗体産生細胞を特異的に抑制するには、いくつかの可能性が考えられる。

1). 補体依存性抗体産生細胞の傷害

免疫脾細胞にRAM 31CまたはNRSを加えた群と、さらに、それぞれに補体を加えた群の4群をもうけ、IgG₁PFC数を比較し、IgG₁PFC抑制が補体依存性かどうか検討した。

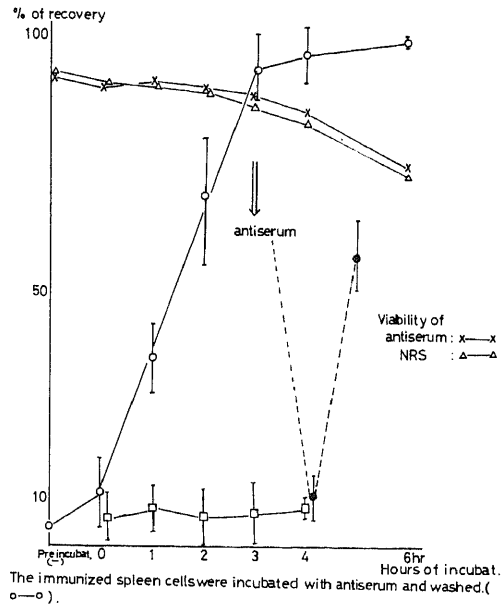


Fig. 6 Recovery of suppressive PFC in SRBC immunized BALB/C mice

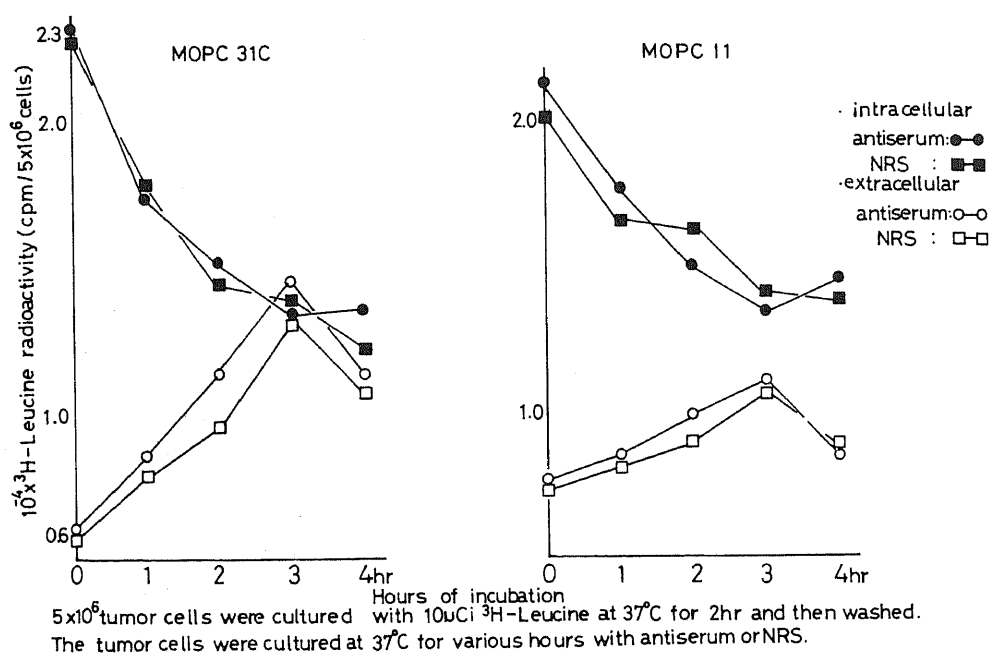


Fig. 7 Effect of antiserum to Immunoglobulin secretion in Myeloma Cells

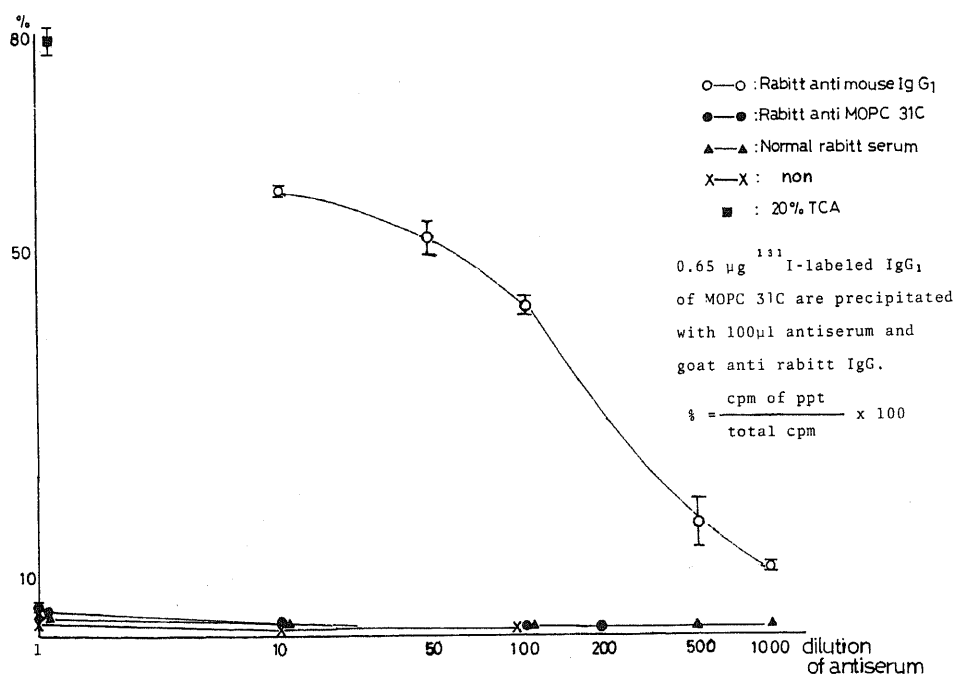
Fig. 8 Lack of anti-mouse IgG₁ activity in Rabitt anti MOPC 31C serum

図6に示すように、補体を加えない群(○-○)では、反応時間が長くなるにつれてPFCの抑制は消失し、3時間反応させた後には、NRS群の値まで回復した。PFC回復後、再度RAM 31Cを加えると(●……●)のように、再びPFCが抑制され、さらに培養を続ける事により、PFCの回復が認められた。一方、補体を加えた群(□-□)では、もはやPFCの回復はみられなかった。

以上の結果は、RAM 31CによるIgG₁産生細胞の抑制は、補体依存性の細胞傷害によると考えられた。免疫脾細胞を抗血清単独で処理した後、一定時間培養した群で、抑制が経時的に消失した。これは、通常抗体と膜上の抗原により形成された複合体は、時間の経過と共にcap形成し、細胞外に放出されるが、依然として膜上に結合状態に残った抗体を有する細胞に、PFC検出時に使用する補体が作用し、抗体産生細胞を傷害したためと推定された。

2). 分泌抑制の検討

抗血清による免疫グロブリン分泌抑制という可能性も、いまだ完全に除去されてはいない。そこで、分泌への影響を検討した。³H-L-leucineを取り込ませたMOPC 31CおよびMOPC11に、RAM 31CまたはNRSを加え、37°Cで一定時間反応させ、細胞内に存在する³H-leucine標識蛋白の減少と、細胞外に分泌さ

れた³H-leucine標識蛋白の増加をみた。結果は、図7に示すように、MOPC 31C、MOPC11は、時間とともに細胞内³Hが減少し、細胞外³Hが増加した。しかし、NRS群とRAM 31C群との間には、その値に差はみられなかった。

このことより、RAM 31CのIgG₁PFC抑制は、IgG₁免疫グロブリン分泌を抑制したものではないと言える。

3). 抗マウスIgG₁活性の検討

次に、RAM 31Cが抗マウスIgG₁活性をもつ可能性も考えられたので、活性を沈降反応で検討した。結果は、図8にみられるように、ウサギ抗マウスIgG₁血清は、10倍希釈で約58%沈降し、50倍から1000倍まで、ほぼ直線関係がみられた。IgG₁PFC検出に使用する抗IgG₁血清の500倍希釈でも、約16%近いIgG₁ミエローム蛋白が沈降した。一方、RAM 31Cでは、原液から200倍希釈まで、NRS群、PBS群とほぼ同値で沈降はみられなかった。

このことより、RAM 31Cには、抗マウスIgG₁活性はみられないと言える。

Ⅲ. H-2および免疫グロブリンアロタイプとIgG₁PFC抑制との関係

抗血清作製に用いたMOPC 31Cは、BALB/c由来であり、抗血清による抗体産生細胞の抑制効果は、単に

Table 1. Inhibitory effects on PFC assay by Rabbit anti monospecific serum to MOPC 31C

mice	pretreatment*	numbers of indirect PFC				direct PFC
		IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgA	
BALB/c H-2 ^d	NRS	598.1±15.8	198.2±81.7	340.7±82.1	361.4±113.7	397.5±36.9
	R-MOPC 31C**	11.5±16.0	206.1±89.7	330.3±77.8	358.7±128.5	362.5±2.1
	Ig-4 ^a , Ig-1 ^{a+} #	(3.8±4.3)***	(102.8±3.8)	(97.4±4.6)	(100.9±6.3)	(92.1±11.0)
SJL/J H-2 ^s	NRS	139.2±28.8	43.9±29.6	71.7±43.0	57.0±14.0	183.7±54.5
	R-MOPC 31C	7.5±9.2	42.5±21.3	66.5±40.0	58.4±16.1	192.0±53.3
	Ig-4 ^b , Ig-1 ^b	(6.5±8.5)	(108.5±27.7)	(92.6±16.7)	(102.5±11.7)	(105.3±14.0)
BC3F ₁ H-2 ^{d/k}	NRS	450.5±23.4	387.9±42.4	97.8±66.0	167.4±89.1	543.3±61.1
	R-MOPC 31C	14.6±11.7	384.5±46.2	89.9±56.0	188.1±78.3	512.1±21.1
	Ig-4 ^a , Ig-1 ^{a+} /a ⁻	(3.1±2.5)	(101.6±19.8)	(89.3±27.9)	(103.7±6.8)	(94.9±5.9)

*; 10⁶ immune spleen cells were incubated with 50μl antisera (5-fold diluted) at 37°C for 45 minutes washed 3 times with RPMI-1640 medium. PFC was assayed by Cunningham's method.

**; Rabbit anti monospecific serum to MOPC 31C.

***; The values indicate percent of PFC relative to NRS-treated PFC.

#; Ig-4; the allotype of IgG₁ immunoglobulin. Ig-1; the allotype of IgG_{2a} immunoglobulin.

BALB/c という形質細胞腫起源に限定された反応でしかないのかもしれない。すなわち、マウス主要組織適合抗原 H-2, 免疫グロブリンアロタイプに規定された反応であるのかもしれない。そこで、BALB/c(H-2^d, IgG₁ アロタイプ Ig4^a, IgG_{2a} アロタイプ Ig1^{a*}) とは異なる SJL/J(H-2^k, Ig4^b, Ig1^b) を、SRBC で 2 次免疫して、免疫脾細胞を抗血清と反応させると、IgG₁ PFC の減少がみられるのかを検討した。結果は、表 1 に示すように、IgG₁ PFC が、NRS 処置群では、 $139.2 \pm 28.8/10^6$ 免疫脾細胞であるのに比べ、抗血清処置群では、わずかに $7.5 \pm 9.2/10^6$ 免疫脾細胞となった。他のクラス、サブクラス PFC には、抑制はみられなかった。

一般に、PFC 法では、10% の増減は誤差範囲と言われている。表 1 にみられるように、BALB/c の SRBC 免疫脾細胞中、IgG_{2a} PFC は、間接 PFC の約 13% である。したがって、BALB/c で IgG_{2a} PFC への効果を判定するのは不十分と考えられた。C3H/He マウスは、血清 IgG 濃度のうち IgG_{2a} が主要であり¹⁶⁾、この C3H/He(H-2^k, Ig4^b, Ig1^{b*}) と BALB/c の F₁ では、脾細胞中に IgG₁ 抗体産生細胞と IgG_{2a} 抗体産生細胞が多数みられると予想された。そこで、SRBC 2 次免疫後、RAM 31C の PFC 抑制効果を (BALB/c × C3H/He)F₁(BC3F₁) で検討した。結果は、表 1 にみられるように、間接 PFC のうち、IgG₁ PFC が 40%、IgG_{2a} PFC 35% であり、RAM 31C で免疫脾細胞を処理すると、IgG₁ PFC のみ抑制され、IgG_{2a} PFC には変化がみられなかった。

このことより、抗血清による IgG₁ PFC 抑制は、マウス H-2, マウス免疫グロブリンアロタイプとは無関係であった。

考 察

B 細胞の産生する免疫グロブリンのクラスあるいはサブクラスに応じた特異抗原の存在を明確にするには、特定のクラスあるいはサブクラス免疫グロブリンのみを合成する細胞を得ることが必要である。しかし、正常抗体産生より、単一のクラスあるいは単一のサブクラス亜集団を集めることは困難である。そこで B 細胞のうち単一クローンが腫瘍化した形質細胞腫を材料に、ウサギを免疫し、ウサギ抗形質細胞血清-抗 MOPC 31C (IgG₁ 産生株) 血清を作製し、IgG₁ サブクラスに特異な膜抗原が存在することを確かめた。

I. 抗 MOPC 31C 特異血清 (PAM 31C) の作製

ウサギ抗 MOPC 31C 血清を非動化し、BALB/c マウス赤血球、肝臓、腎臓で吸収した後、抗 MOPC 31C 血

清は、リンパ球共通抗原、B 細胞抗原¹¹⁾⁽¹²⁾、形質細胞腫抗原¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾に対して抗体活性を示すと考えられた。そこで、まず、BALB/c 胸腺細胞で吸収し、リンパ球共通抗原活性を除去した。吸収後、抗血清は、胸腺細胞には傷害性を示さなくなったが、脾細胞、形質細胞腫に傷害性を示した。このことは、この段階の抗血清には、抗マウス B 細胞活性 (mouse B lymphocyte Antigen MBLA)¹¹⁾⁽¹²⁾、抗形質細胞腫活性 (mouse specific plasma cell antigen MSPCA)¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾をもつと考えられた。この抗血清-RAMB-を、さらに、MOPC 31C に対し特異的にするため、IgG_{2a} 産生クローンとしての IgG_{2a} 産生形質細胞腫 MOPC11 で吸収した。この吸収により、抗 MBLA、抗 MSPCA と考えられる抗体活性は除去され、MOPC 31C に特異的抗血清ができると考えられた。つまり、胸腺細胞および MOPC11 で吸収した抗血清 (RAM 31C) は、脾細胞や MOPC11 に対する傷害性を消失したが、なお、MOPC 31C には、⁵¹Cr 標識法を用いる細胞傷害試験で傷害性が確かめられた。

II. RAMB および RAM 31C 血清の抗体産生細胞への効果

1). 直接 PFC の抑制効果

従来から、ウサギ抗マウス B 細胞血清¹¹⁾⁽¹²⁾およびウサギ抗形質細胞腫血清¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾は、直接 PFC、間接 PFC ともに抑制すると報告されている。そこで抗 MOPC 31C 血清を胸腺細胞のみで吸収した段階の抗血清 (RAMB) の直接 PFC への効果をみた。結果は、諸家の結果と同様に、SPBC 1 次免疫脾細胞の直接 PFC は抑制された。しかし、この直接 PFC の抑制効果は、RAMB を MOPC11 で定量吸収し、RAMB から、抗 MBLA、抗 MSPCA 活性が除去されるにつれ消失し、MOPC11 10⁸ 個以上による吸収 (RAM 31C) では、その抑制は完全に消失した。

2). 間接 PFC の抑制効果

SRBC で 2 次免疫した脾細胞を、RAM 31C と反応させ、各クラス、サブクラス間接 PFC を行なった。結果は、IgG₁ PFC のみ 90% 以上抑制された。

以上の結果は RAM 31C は、MOPC 31C 形質細胞腫に特異的に傷害性を有し、さらに、IgG₁ 抗体産生免疫脾細胞にも特異的に反応すると考えられた。

抗形質細胞腫血清で間接 PFC、とりわけ、クラス、サブクラス PFC の抑制効果を検討した報告は少ない。

Harris ら¹³⁾と渡辺ら¹⁴⁾⁽¹⁵⁾は、高橋ら¹⁷⁾が同種抗形質細胞腫血清で見いだした Pc-1 抗原を、異種抗形質細胞腫血清で明らかにしようとした。彼らは、抗形質細胞腫血清を正常胸腺細胞、および、正常脾細胞で吸

収すると、抗血清は、直接 PFC、間接 PFC とともに抑制し、抗体産生細胞に共通する抗原がみられたと報告している。本論文では、IgG₁ 抗体産生細胞に共通する抗原をみいだすことを目的としており、ウサギ抗 MOPC 31C 血清を正常脾細胞（各種クラス、サブクラス抗体産生細胞を含む）で吸収するのではなく、IgG_{2b} 抗体産生細胞の単一クローンである MOPC11 で吸収した。この吸収操作が、IgG₁ PFC の特異抑制を示す抗血清が得られた原因と考えられた。

一方、成内らは¹⁸⁾、ウサギ抗 X 5563 (IgG_{2a} 産生株) 血清を胸腺細胞で吸収すると、抗血清は脾細胞に傷害性を示さないが、抗原投与前に抗血清を *in vivo* 注射しておく、IgG_{2a} 血清抗体がみられず、IgG_{2a} サブクラス特異抗血清ができ、しかも、抗血清は、IgG_{2a} 抗体前駆細胞に作用すると報告している。この結果は、RAM 31C が IgG₁ サブクラスに特異性を示すことと同様である。しかし、RAM 31C が IgG₁ 抗体産生細胞に効果を示すことは明確であるが、IgG₁ 抗体前駆細胞にも反応するのかは、さらに検討が必要である。

Ⅲ. 抗体産生細胞抑制の機序

抗形質細胞腫血清が、どのような機序で抑制を引き起すのか、この点に関しては十分な解析がみられない。RAM 31C の IgG₁ PFC 抑制は、SRBC 2 次免疫脾細胞を RAM 31C と 37°C で反応させた後、補体と抗原 (SRBC) を加えて PFC を検討した。したがって、次の 3 つの機序が考えられる。

1). 抗体産生細胞に抗血清が結合し、PFC 検出に使用する補体が活性化され、抗体産生細胞が直接傷害される場合、

2). 抗血清で認識される抗体産生細胞抗原自身が分泌を抑制する場合、あるいは、抗体産生細胞に抗血清が結合すると、膜の立体構造が変化し、分泌が阻害される場合、

3). 抗血清が抗マウス IgG₁ 活性を有する場合である。

これらの点について検討した。

1). 補体依存性細胞傷害活性

RAM 31C が IgG₁ PFC を抑制する場合、PFC を検出する時、加えた補体によって、抗体産生細胞が傷害されると考えた。したがって、あらかじめ RAM 31C と補体を加えて免疫細胞を処理すれば、PFC は減少してしまうと考えられた。結果は図 6 に示すように PFC の減少がみられた。

一般に、リンパ球膜抗原に抗体が結合すると、補体がない場合には、37°C のもとでは、複合体は、cap 形成を起し、ついには、細胞外へ放出され、抗原が新た

に再生されるまで、リンパ球は抗体と反応しないと言われている。したがって、図 6 の結果に示すように、RAM 31C を単独で反応させた免疫脾細胞を再び 37°C においた後には、経時的に PFC 抑制が減少し、NRS 群と同値まで回復した。

これより、PFC 抑制は、抗血清と反応した抗体産生細胞に補体が作用し、細胞傷害によると考えられた。

2). 分泌抑制

あらかじめ ³H-L-leucine を取り込ませた MOPC 31C、および MOPC11 に、RAM 31C または、NRS を加え、一定時間後の、細胞内³H 標識蛋白量を測定し、分泌への影響をみた。結果は、NRS と RAM 31C との間で、分泌量に差はみられなかった。このことは、膜上に生じた抗原-抗体結合物により IgG₁ の分泌が阻害される可能性は否定的と言えた。

3). 抗マウス IgG₁ 活性

RAM 31C の IgG₁ PFC 抑制効果は、間接 PFC 法を用いている。間接 PFC を検出するために、2 次抗体としてウサギ抗マウス IgG₁ 血清を加えている。もし、このウサギ抗マウス IgG₁ 血清の濃度が高ければ、PFC の減少がみられることはよく知られている。したがって、RAM 31C の抗マウス IgG₁ 活性を沈降法で検討した。¹³¹I 標識マウス IgG₁ を抗原に、RAM 31C、ウサギ抗マウス IgG₁ 血清、NRS をそれぞれ加え、さらに、2 次抗体としてヒッジ抗ウサギ IgG₁ 血清を使用して沈降反応を行なった。結果は、RAM 31C には、抗マウス IgG₁ 活性はみられず、IgG₁ PFC 抑制は、抗マウス IgG₁ 活性によるものではないと言えた。

以上より、SRBC に対する IgG₁ PFC の RAM 31C による抑制は、IgG₁ 抗体産生細胞が抗体と補体により傷害された結果と言える。

Ⅲ. H-2, アロタイプと抑制効果

細胞膜抗原はマウスの系により個々が有する H-2 抗原に特徴づけられている。そこで、RAM 31C による IgG₁ PFC の抑制が H-2 型とどのような関係にあるのか。また、免疫グロブリンにもマウスの系による遺伝的特性がみられる。そこで、PFC 抑制とマウス免疫グロブリンアロタイプとの関係を検討した。すなわち、抗血清の免疫源が BALB/c (H-2^d) 由来形質細胞腫であり、RAM 31C による PFC 抑制は、BALB/c に限定したこともかもしれない。結果は、BALB/c (H-2^d, Ig4^a, Ig1^{a+}) と同様に、SJL/J (H-2^k, Ig4^a, Ig1^b) でも、IgG₁ PFC のみ抑制され、(BALB/c × C3H/He)F₁ (H-2^{d/k}, Ig4^{a/a} Ig1^{a+/b-}) でも同様であった。このことより、RAM 31C による IgG₁ PFC 抑制は、H-2, 免疫グロブリンア

ロタイプと関係ないと推定された。また、このことは、同種抗形質細胞腫血清でみられたマウス系統間の差異¹⁷⁾は、異種で抗血清を作製しているため認識されず、IgG₁ 形質細胞腫-IgG₁ 抗体産生細胞の共通抗原部分に対して抗血清は向けられていると考えられた。

また、SRBCとは異なる牛ガンマグロブリンで2次免疫したBALB/cでも、IgG₁ PFCのみが抑制された(結果省略)。このことより、抗血清によるPFC抑制は、抗原とも無関係と言えた。

以上より、RAM 31Cが反応するIgG₁ 抗体産生細胞の膜抗原の性質は、マウス主要組織適合抗原H-2、免疫グロブリンアロタイプや抗原とは無関係と考えられた。

IV. 既存B細胞膜抗原および形質細胞腫抗原との関係

リンパ球とくにB細胞膜上には、同種免疫で検出されるLy4抗原¹⁹⁾、また、形質細胞には同種抗形質細胞腫血清でみられるPc-1抗原¹⁷⁾が存在する。しかし、ここで作製した抗形質細胞腫血清は異種免疫でえられているのでPc-1等同種抗原に対する活性は存在しないと考えられる。また、Ly-4抗原は、MBLA抗原をもつ抗体産生前駆細胞に存在し、しかも、抗Ly-4血清は間接PFCを抑制しないし、さらにLy-4抗原はH-2^d マウスには存在しないことより無関係と思われる。

異種抗形質細胞腫血清では、抗MBLA活性¹¹⁾¹²⁾、抗マウスTh-B活性²⁰⁾²¹⁾が存在する。抗MBLA活性は、MOPC 31C血清をMOPC11で吸収すると脾細胞に傷害性を示さなくなったことより、抗血清には含まれていないと考えられた。またTh-B抗原は、胸腺細胞の一部にも共通する抗原である。ここで検討した抗MOPC 31C血清は、胸腺細胞で吸収されており、胸腺細胞に傷害性を示さないことより異なったものと考えられた。

また、Harris¹³⁾、渡辺¹⁴⁾¹⁵⁾らの抗形質細胞腫血清は、形質細胞-形質細胞腫に共通した抗原に対して向けられており、RAM 31CのようなIgG₁ サブクラス特異性がみられないことより、異なったものであると考えられた。

また、成内¹⁶⁾らは、ウサギ抗X 5563 (IgG_{2a} 産生株) 血清を作製し、胸腺細胞で吸収すると、脾細胞へ傷害性を示さないが、抗原投与前in vivoに抗血清を注射しておく、IgG_{2a} 血清抗体産生が抑制され、しかもこの抑制は、IgG_{2a} 抗体産生前駆細胞あるいは、抗体産生細胞のごく初期に作用すると報告している。

この結果は、本論文のRAM 31CがIgG₁ 抗体産生細胞に効果を示すことと同様である。しかし、RAM 31Cが、IgG₁ 抗体産生前駆細胞にどのような効果を示すのかさらに検討が必要であるが、IgG₁ 抗体産生細胞に効果を示すこと、およびIgG₁ 形質細胞腫に共通して効果を示すことより、IgG₁ 抗体産生系細胞の成熟した細胞にRAM 31Cは作用すると考えられた。また、RAM 31CのIgG₁ PFC抑制効果は、X 5563で吸収されないことより(結果省略)、IgG₁ サブクラス特異抗原の存在が示唆された。

次に、クラス、サブクラスに特異性をもち、抗原体に特異性をもたない膜の受容体あるいは抗原についての報告はあまりないが、最近、Taussig²²⁾、岸本⁵⁾らは、B細胞が抗原で刺激されると、B細胞膜上にT細胞因子を受ける受容体ができ、受容体に因子が結合すると抗体産生が飛躍的に増大すると報告し、この受容体と因子の間にはH-2内のIa抗原の一致が必要であると報告している。また、Ia抗原は、従来、同種免疫で検出されているが、最近、Parish²³⁾によれば、マウスIa抗原の共通部分に対してウサギで抗血清が作製できるという報告もある。

これらのことを考えると、抗MOPC 31C血清は、IgG₁ サブクラス特異受容体(抗原)に対して抗体活性をもつのかもしない。しかし、この点に関しては、未だ検討が必要である。

また、抗血清の免疫材料が形質細胞腫であることにより、腫瘍抗原に対する抗体活性も含まれている可能性もあるが、正常抗体産生細胞に作用することにより、ここでは否定的である。

したがって、この論文で作製した抗形質細胞腫血清によって検出される抗原は、いままでの既知の抗原とは異なり、新たな抗原と考えられた。さらに、この抗原が既存の抗原と、あるいは、受容体とどのような関係にあるのかを検討する必要がある。

結 論

IgG₁ 抗体産生細胞に共通する抗原が存在するのかを、ウサギ抗形質細胞腫(MOPC 31C, IgG₁ 産生株)血清で検討した。

1. ウサギ抗MOPC 31C血清は、in vitro吸収により、MOPC 31Cに特異的傷害性をもつ抗血清となった。

2. この特異抗血清を、2次免疫脾細胞とあらかじめ反応させ、間接PFCを行なうと、IgG₁ PFCのみ抑制された。

3. この抗血清の IgG₁ PFC 抑制の機序は、抗血清の抗マウス IgG₁ 活性でもなく、免疫グロブリン分泌抑制でもなく、抗体産生細胞膜抗原に、抗血清が結合し、さらに補体が作用する抗体産生細胞の細胞傷害によると考えられた。

4. この抗血清で検出された抗原は、IgG₁ 抗体産生細胞に共通で、H-2、免疫グロブリンアロタイプとは無関係であり、既存の B 細胞膜抗原、形質細胞抗原、形質細胞腫抗原とは異なる新たな抗原と考えられた。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導を賜りました恩師右田俊介教授に対し感謝の意を表します。また、本実験を共にし、御鞭達、御協力下さった免疫生物部、坂井俊之助教授をはじめ教職員各位に感謝します。

文 献

- 1) Cantor, H. & Boyse, E. A. : Regulation of cellular and humoral immune responses by T-cell subclasses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 23-32 (1976)
- 2) Vadasa, M. A., Miller, J. E. A. P., McKenzie, I. F. C., Chism, S. E., Shen, F-W., Boyse, E. A., Gamle, J. R. & Whitelaw, A. M. : Ly and Ia antigen Phenotypes of T cells involved in delayed-type hypersensitivity and in suppression. J. Exp. Med., 144, 10-19 (1976)
- 3) Tada, T., Taniguchi, M. & David, C. S. : Suppressive and enhancing T-cell factors as I-region gene products : properties and the subregion assignment. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 119-127 (1976)
- 4) Jennings, J. J. & Rittenberg, M. B. : Evidence for separate subpopulation of B cells responding to T-independent and T-dependent immunogens. J. Immunol., 117, 1749-1752 (1976)
- 5) Suemura, M., Kishimoto, T., Hirai, Y. & Yamamura, Y. : Regulation of antibody responses in different immunoglobulin classes. III. In vitro demonstration of "IgE class-specific" suppressor functions of DNP-mycobacterium-primed T cell and the soluble factor released from these cells. J. Immunol., 119, 149-155 (1977)
- 6) Cunningham, A. J. & Szenberg, A. : Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. Immunology, 14, 599-600 (1968)
- 7) Boyse, E. A., Old, L. J. & Stockert, E. : Some further data on cytotoxic isoantibodies in the mouse. Ann. NY. Acad. Sci., 99, 574-587 (1962)
- 8) Wigzell, H. : Quantitative titrations of mouse H-2 antibodies using ⁵¹Cr-labelled target cells. Transplant., 3, 423-431 (1965)
- 9) 川村明義 : 蛍光抗体法, 免疫の生化学 (蛋白質 核酸 酵素 編集部編) 215-223 頁, 東京 共立出版, 1967
- 10) 尾上 薫 : 蛋白抗原の¹³¹Iによる標識法, 免疫実験操作法 I (日本免疫学会編) 41-42 頁 金沢, 日本免疫学会, 1971
- 11) Raff, M. C., Nase, S. & Mitchison, N. A. : Mouse specific bone marrow-driven lymphocyte antigen as a marker from thymus-independent lymphocytes. Nature, 230, 50-51 (1971)
- 12) Kakiuchi, T., Nariuchi, H. & Tamura, N. : Preparation and effects of anti-B cell serum. J. Immunol., 116, 1224-1227 (1976)
- 13) Harris, N. S., Jagarlamoodu, S. M., McKhann, C. F. & Najarian, J. S. : The effect of anti-plasma cell sera on the primary immune response. J. Immunol., 108, 958-964 (1972)
- 14) Watanabe, T., Yagi, Y. & Pressman, D. : Antibody against neoplastic plasma cells. I. Specific surface antigens on mouse myeloma cells. J. Immunol., 106, 1213-1221 (1971)
- 15) Watanabe, T., Yagi, Y. & Pressman, D. : Antibody against neoplastic plasma cells. II. Suppressive effect on antibody producing cells. J. Immunol., 107, 1706-1713 (1971)
- 16) Sakai, S., Motonishi, K. & Migita, S. : Quantitative estimations of five classes of immunoglobulin in inbred mouse strains. Immunology, 32, 861-866 (1977)
- 17) Takahashi, T., Old, L. J., Hsu, C. J. & Boyse, E. A. : A new differentiation antigen of plasma cells. Eur. J. Immunol., 1, 478-482 (1971)
- 18) Nariuchi, H., Usui, M., Fujimoto, Y., Hirakawa, K. & Matsubashi, T. : Antiplasma cell serum. I. Selective suppression of γ_2 -hemolysin in mice. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 40, 590-602 (1971)
- 19) McKenzie, I. F. C. & Shell, G. D. : Ly 4.2 : A cell membrane alloantigen of murine B lymphocytes. I. Population studies. J. Immunol.,

114, 848-855 (1975)

20) Yutoku, M., Grossberg, A. & Pressman, D. : Preparation and properties of rabbit antimouse plasmacyte serum purified by in vivo absorption : Further evidence for a new antigenic determinant on plasmacytes. *J Immunol.*, **112**, 911-918 (1974)

21) Yutoku, M., Grossberg, A. & Pressman, D. : The expression on mouse lymphoid cells of Th-B, an antigen common to mouse B cells and thymus cells. *J. Immunol.*, **115**, 69-74 (1975)

22) Taussig, M., Munro, A. J. & Luzzai, A. L. : I-region products in in cell cooperation, p883-567. *In* D. H. Katz & B. Benacerraf (ed.), The role of products of the histocompatibility gene complex in immune responses, Academic Press Inc., New York, 1976

23) Parish, C. R., Chilcott, A. B. & McKenzie, I. F. C. : Low molecular weight Ia antigens in normal mouse serum. I. Detection and production of a xenogeneic antiserum. *Immunogenetics*, **3**, 113-128 (1976)

Specific Antigen Shared with Plasmacytoma Cells and B Lymphocytes, Producing IgG₁ Immunoglobulin. Osami Daimaru, Department of Molecular Immunology, (Director : Prof. S. Migita) Cancer Research Institute, Kanazawa University. Kanazawa 920, Japan. *J. J. Med. Soc.*, **88**, 523—535 (1979).

Abstract The murine B cells antigen(s), specific for IgG₁ producing cells, was detected by hetero-antiserum produced with a rabbit. Rabbit antiserum raised by repeated injections with IgG₁ producing plasmacytoma cells (MOPC 31C) was turned into monospecific antiserum by serial absorption as follows. After the extensive absorption of this antiserum with thymus cells, red blood cells, liver cells, kidney cells and MOPC 11 plasmacytoma cells which produce the IgG_{2b} immunoglobulin, MOPC 31C cells were still effectively killed by this antiserum.

We examined the effects of this antiserum upon antibody forming cells. When the spleen cells from BALB/c mice immunized by SRBC were treated with this antiserum and complement, IgG₁ plaque forming cells were completely abolished, while IgM, IgG_{2a}, IgG_{2b} and IgA antibody forming cells to SRBC remained unaffected.

Inhibition of IgG₁ antibody producing cells to SRBC by this specific antibody was effective not only for BALB/c strain, but also for SJL/J strain which is carrying different haplotype of H-2 and allotype of immunoglobulin from BALB/c strain.

So it is suggested that the reactivity of this antiserum to IgG₁ producing cells was not restricted with H-2 haplotype and allotype of immunoglobulin.

Therefore, this hetero-antiserum contained specific antibody to new antigen(s) commonly expressed on the surface of IgG₁ producing cells.